

## 明 細 書

## アルツハイマー病の診断方法

## 5 技術分野

本発明はアルツハイマー病の検出方法及び診断方法に関する。

## 背景技術

アルツハイマー病(AD)及びアルツハイマー型老年痴呆症(SDAT)は50歳台から  
10 発症し、加齢に従ってその発症頻度が増加する疾患である。特に本邦においては、  
2010年には全国民の1/4が70歳以上の高齢化社会を迎えるため、AD/SDATの  
増加が予測され、病態の進行によって国民生産性の低下及び医療費負担の著しい  
増加を招来する。従って、早期診断によって病態の進行を阻止することが急務で  
ある。そのためには、血中又は脳脊髄液中にその病態特異的なマーカーを発見し、  
15 正確にそれを測定することが重要である。

病態特異的なマーカーの発見のために、すでに多くの試みが為されている。そ  
れらの物質としては、ニューロフィラメント重鎖、チューブリン、グリアルフィ  
ブリラー酸性タンパク質、S100タンパク質、タウタンパク質、ベーターアミ  
ロイドプレカーサーペプチド、ミエリン塩基性タンパク質、ヘパラン硫酸プロテ  
20 オグリカンなどが挙げられ、さらにこれらの物質に対する自己抗体などの検索が  
なされてきた[Terryberry JW, Thor G, Peter JB. Autoantibodies in  
neurodegenerative diseases: antigen-specific frequencies and intrathecal  
analysis. Neurobiol Aging 1998; 19: 205-216.]。これらの検索は無効ではない  
が、特異性に欠けるため、高感度に検出することが困難である。以上のことから、  
25 AD及びSDATに対し、特異性に富んだ簡易診断法が切に望まれるところである。

## 発明の開示

本発明は、アルツハイマー病、アルツハイマー型老年痴呆症などの脳神経系疾患を特異的に検出する方法、及びこれらの疾患の診断法を提供することを目的とする。

5 本発明者は、上記課題を解決するために鋭意研究を行った。そして、アルツハイマー病患者等の血中の抗ヒストン H1 抗体及び抗ポリ ADP-リボース抗体を測定することにより、上記疾患を検出し得ることを見出し、本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明は以下の通りである。

10 (1) ポリ ADP-リボース及び/又はヒストン H1 と生体試料とを反応させて、ポリ ADP-リボースに対する抗体及び/又はヒストン H1 に対する抗体を検出することを特徴とする、神経系疾患の検出方法。

本発明においては、生体試料として血液、唾液、漿液、リンパ液、血清等の体液を使用することができる。また、神経系疾患としては、アルツハイマー病 (AD) 又はアルツハイマー型老年痴呆症 (SDAT) が挙げられるが、これらの疾患に限定されるものではない。AD 又は SDAT 患者の生体試料 (例えば体液) 中には、  
15 抗ポリ ADP-リボース抗体 (「抗 pADPR 抗体」ともいう)、抗ヒストン H1 抗体 (「抗 H1 抗体」ともいう) 又はこれらの両者が含まれており、その自己抗体のサブクラスは IgG1 及び IgG2 のいずれも存在する。これに対し、代表的な自己免疫疾患である全身性エリテマトーデス (SLE) 患者の自己抗体のサブクラス  
20 は、IgG2 が主である。従って、IgG1 と IgG2 との比 (G1/G2 比) を測定することにより、その値を指標として被験患者が AD 又は SDAT であるのかを判断することができる。また、それらの再分類 (亜型) をも可能にする。また、抗 pADPR IgG、抗ヒストン H1 IgG のほか、抗 pADPR IgA、抗 H1 IgA を測定することにより、その値を指標として被験患者が AD 又は SDAT であるのかを判断すること  
25 ができる。

(2) ポリ ADP-リボース及び/又はヒストン H1 と生体試料とを反応させて、ポリ ADP-リボースに対する抗体及び/又はヒストン H1 に対する抗体を検出するこ

とを特徴とする、神経系疾患の診断方法。

生体試料、神経系疾患の具体的内容は上記(1)記載の発明と同様である。また、本発明の診断方法においても、IgG1 と IgG2 との比を指標として診断することが可能である。また、抗 pADPR IgG、抗ヒストン H1 IgG のほか、抗 pADPR IgA、  
5 抗 H1 IgA を測定することにより、その値を指標として被験患者が AD 又は SDAT であるのかを判断することもできる。

(3) ポリ ADP-リボース及び/又はヒストン H1 を含む、神経系疾患の診断又は検出用キット。

(4) ポリ ADP-リボース及び/又はヒストン H1 が固相に固定された、神経系疾  
10 患の診断又は検出用プレート。

上記キット及びプレートにおいて、神経系疾患は例えばアルツハイマー病又はアルツハイマー型老年痴呆症である。

(5) ヒストン H1 を、0.25 M NaCl 及び 25 mM トリス緩衝液(pH7.4)からなる溶液で希釈した後、固相に固定することを特徴とする、ヒストン H1 の固相への  
15 固相化方法。

#### 図面の簡単な説明

図 1 は、ポリ ADP-リボースの単位である ADP-リボースの構造を示す図である。

図 2 は、AD 患者及び SDAT 患者における抗 pADPR 抗体及び抗 H1 抗体の検  
20 出結果を示す図である。

図 3 は、SLE 患者における抗 pADPR 抗体及び抗 H1 抗体の検出結果を示す図である。

図 4 は、AD 患者及び SDAT 患者における抗 H1 抗体と抗 pADPR 抗体との相関関係を示す図である。

25 図 5 は、SLE 患者における抗 H1 抗体と抗 pADPR 抗体との相関関係を示す図である。

図 6 は、AD 患者及び健常人における抗 pADPR IgG 及び抗 pADPR IgA の検

出結果を示す図である。

発明を実施するための最良の形態

## 1. 概要

5      最近 AD 患者の脳神経細胞、とりわけ星膠細胞（アストロサイト）の細胞核における ADP-リボシル化活性の上昇[Increased poly (ADP-ribosyl) action of nuclear proteins in Alzheimer's disease. Brain 1999; 122: 247-253]、及び星膠細胞膜におけるヒストン H1 の高発現[Bolton SJ, Russelakis-Carneiro M, Betmouni S, Perry, VH. Non-nuclear histone H1 is upregulated in neurons and astrocytes in prion and Alzheimer's diseases but not in acute neurodegeneration. Neuropathol Applied Neurobiol 1999; 25: 425-432.]に関して報告がされている。この二つの現象には密接な関係のあることが知られている。ADP-リボシル化反応は、主にタンパク質に生じる現象であり[Hayaishi O, Ueda K. Poly (ADP-ribose) and ADP-ribosylation of proteins. Ann Rev Biochem 1977; 46: 95-116]、タンパク質の修飾反応として知られている。修飾、つまり ADP リボシル化される代表的なタンパク質がヒストン H1 である。H1 は、核クロマチン、及びその構成単位であるヌクレオソーム(NS)の凝縮のために重要な働きを演じている。その H1 が ADP-リボシル化されると、その度合いによってクロマチンがタイトになったり、ルーズになったりする[Kanai Y, Kawamitsu H, Tanaka M et al. A novel method for purification of poly (ADP-ribose). J. Biochem 1980; 88: 917-920]。このことは、クロマチンの ADP リボシル化反応が遺伝子発現の調節に深く関わり、また発ガン物質などで DNA が切断された場合にそれを修復する作用を有することを意味する [Virag L, Suzabo C. The therapeutic potential of poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors. Pharmaceut Rev 2002; 54: 375-429]。さらに、近い将来において、ADP-リボシル化反応は、加齢と細胞核クロマチンの機能的、形態的变化とも深く関わってくるものと考えられる。

本発明者は、ADP-リボシル化の延長反応で合成されるポリ ADP-リボース（「pADPR」という）が、塩基性タンパク質と荷電結合すると、マウスやウサギに抗 pADPR 抗体を産生させることを初めて報告した[Kanai Y, Miwa M, Matsushima T, Sugimura T. Studies on poly (adenosine diphosphate ribose) antibody. Biochem Biophys Res Commun 1974; 59: 300-306]。さらに、ADP-  
5 リボシル化反応を受けたヒストンでウサギを免疫すると、抗ヒストン抗体と抗 pADPR 抗体が同時に産生され、未修飾ヒストンで免疫した場合と比べてはるかに強力な抗体が産生されることを見出した[Kanai Y, Sugimura T. Comparative studies on antibodies to poly(ADP-ribose) in rabbits and patients with  
10 systemic lupus erythematosus. Immunology 1981; 43: 101-110.、Kanai Y, Sugimura T. Systemic lupus erythematosus. In: ADP-Ribosylation Reactions. Hayaishi O, Ueda K eds. Academic Press, New York 1982: pp.533-546]。

以上のような本発明者の研究実績から、本発明者は AD 患者アストロサイト膜表面に発現されているヒストン H1 は ADP-リボシル化されている可能性が高い  
15 と想定し、AD 患者血中の抗ヒストン H1 抗体と抗 pADPR 抗体を測定するに至った。

一方、免疫学的な見地とは別に、脳の虚血などの血流障害後に生じる神経細胞の修復には、ポリ ADP-リボシル化が深く関与することが知られている[Szabo C, Dawson VD. Role of poly (ADP-ribose) synthetase in inflammation and  
20 ischemia-reperfusion. Trends Pharmacol Sci 1998; 19: 287-298]。この場合は、DNA 障害の修復のために ADP-リボシル化反応が過度に促進する結果、NAD が枯渇して細胞死を誘導し、脳の変性に加担することになる。このような脳の虚血・血流障害時に PARP (pADPR 合成酵素) の阻害剤を投与すると神経細胞死や変性を抑制できることから、PARP の阻害剤の開発が積極的に行われている[Virag  
25 L, Szabo C. The therapeutic potential of poly (ADP-ribose) polymerase inhibitors. Pharmaceut Rev 2002; 54: 375-429]。これを裏付けるように、PARP のノックアウトマウスでは脳の血流障害に伴う神経細胞死が抑制されることが報

告されている[Ellasson MJL, Sampei K, Mandir AS et al. Poly (ADP-ribose) polymerase gene disruption renders mice resistant to cerebral ischemia. Nature Med 1997; 3: 1089-1095].

5 以上を総括すると、AD では脳での ADP-リボシル化が促進し、pADPR が脳に沈着することが予測される。なお、最近では ADP-リボシル化のターゲット分子は H1 よりも PARP のほうが頻度が高いといわれている[Lindhal T, Satoh M, Poirier GG, Klunland A. Posttranlational modification of poly(ADP-ribose) polymerase induced by DNA strand break. Trends Biochem Sci 1995; 20: 404-411]。加齢にともなって予想される脳関門の緩和は、pADPR の血中への漏洩をもたらし、ひいては免疫系に接触する機会を増加させることになり、AD において pADPR に対する免疫応答を調べる理論的根拠は極めて高い。

## 2. 神経系疾患の検出方法

15 本発明は、ポリ ADP-リボース及び／又はヒストン H1 と生体試料とを反応させて、ポリ ADP-リボースに対する抗体及び／又はヒストン H1 に対する抗体を検出することを特徴とする神経系疾患の検出方法を提供する。つまり、本方法は、生体試料中の抗ポリ ADP-リボース抗体及び／又は抗ヒストン H1 抗体の量を、ポリ ADP-リボース及び／又はヒストン H1 を用いて検出することにより、神経系疾患を検出する方法である。

### 20 (1) 神経系疾患

本発明において神経系疾患とは、ADP リボシル化が関与する神経系の疾患を広く含むものであり、例えばアルツハイマー病 (AD) 及びアルツハイマー型老年痴呆症(SDAT)が含まれる。特に、本方法は疾患時に抗ポリ ADP-リボース抗体及び／又は抗ヒストン H1 抗体の発現が確認される疾患において有用である。

### 25 (2) ポリ ADP-リボース及び／又はヒストン HI と生体試料との反応と抗体の検出

本発明の方法は、ポリ ADP-リボース及び／又はヒストン H1 が固相化された

プレートに、生体試料を添加して反応させ、試料中の抗ポリ ADP-リボース抗体及び／又は抗ヒストン H1 抗体を検出するものである。

(a) ポリ ADP-リボース (pADPR)

本発明において用いるポリ ADP-リボースは、ADP-リボース (図 1) が複数 (図 1 「n」) 結合したものである。図 1 中、「R」はリボース、「P」はリン酸基及び「Ad」はアデニンを示す。pADPR は、nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) や NAD<sup>+</sup> から合成することができる。例えば、NAD を基質として、仔牛胸腺核を酵素源として合成し、精製して得ることができる [Kanai Y, Kawamitsu H, Tanaka M et al. A novel method for purification of poly(ADP-ribose). J. Biochem 1980; 88: 917-920]。本発明で用いられるポリ ADP-リボースは抗ポリ ADP-リボース抗体に認識される限りその長さは限定されないが、平均鎖長は 10 ~50、好ましくは 20~40、より好ましくは 30 である。なお、本発明に用いる pADPR は高純度であることが好ましく、pADPR に含まれる DNA やヒストンの割合は 1% 以下であることが好ましい。

(b) ヒストン H1

本発明において用いるヒストン H1 は、ヒト由来の細胞などの試料から全ヒストンを精製した後、イオン濃度勾配により全ヒストンから分離精製することができる。例えば、ヒト前骨髄性白血病細胞株 HL60 細胞核より全ヒストンを単離し、0.25 M NaCl + 25 mM トリス緩衝液 (pH7.4) (溶液 A) に対して透析し、可溶化する。さらに陽イオンカラム HiTrap SP (Amersham Biosciences) を用い、酸性 (pH3.5) 条件下で塩化ナトリウム (NaCl) の濃度勾配によって全ヒストンから H1 のみを分離することができる [Kanai Y, Sugimura T. Comparative studies on antibodies to poly(ADP-ribose) in rabbits and patients with systemic lupus erythematosus. Immunology 1981; 43: 101-110.]。

全ヒストンは、上記の溶液 A に対して透析することで、可溶化に成功した。従来、ヒストンは通常希塩酸又は塩を含まない水溶液中でのみ溶解することが知られていたが、この状態では以下に述べる ELISA の系でヒストンを固相化する場

合、付着率の低下をきたしていた。しかしながら、本発明において上記の溶液 A を使用することにより、ヒストン H1 の固相への付着効率を高めることに成功した。なお、本発明に用いるヒストン H1 は高純度であることが好ましく、ヒストン H1 に含まれる DNA の含有量は 1%以下であることが好ましい。

5 (c) プレート

上記 (a) で得られた pADPR 及び／又は上記 (b) で得られたヒストン H1 は、例えば上記の溶液 A 又は PBS 等の適当なバッファーで希釈し、マイクロタイタープレート等に適量加えて 4℃で一晩～一昼夜静置して、固相 (プレート) に固定して固相化する。マイクロタイタープレートは、市販のものをを用いること  
10 ができ、当業者であれば適宜選択することができる。例えば 96 well 型の Immulon 2Hb を用いる場合、50～100  $\mu$ l の pADPR 及び／又はヒストン H1 溶液を添加することができる。

また、上述のようにヒストン H1 の希釈には、溶液 A を用いることが好ましい。本発明は、ヒストン H1 を、溶液 A (0.25 M NaCl + 25 mM トリス緩衝液 (pH7.4))  
15 で希釈した後、固相に固定することを特徴とする、ヒストン H1 の固相化方法を含む。例えば、上記 (b) に記載するように、全ヒストンを溶液 A に対して透析して可溶化したものから精製したヒストン H1 又は異なる方法で得たヒストン H1 を、溶液 A で希釈して、得られる希釈溶液をプレート等の固相に添加することでヒストン H1 を固相化する方法を含む。

20 次に、pADPR 及び／又はヒストン H1 が固相化されたプレートを TBS (25 mM トリス, 140 mM NaCl, 0.04%窒化ソーダ (NaN<sub>3</sub>), pH7.4)、PBS 等のバッファーで洗浄する。次に、プレート上の抗原未吸着部位を 1～5%スキムミルク又は 0.5～3%ウシ血清アルブミン (BSA)含有 TBS などを 96 well プレートの場合 100～200  $\mu$ l 添加して、室温で 1 時間反応させることにより遮蔽 (ブロッキング) する。  
25 その後 TBS 等で 1～3 回洗浄して、ELISA 用抗原プレートを作製する。

本発明は、当該ポリ ADP-リボース及び／又はヒストン H1 が固相に固定された (固相化された) 神経系疾患の診断又は検出用のプレート (以下、「本発明の



プレート」とも言う)も含む。また、本発明のプレートの固相化、洗浄、ブロッキングの条件は、当業者であれば適宜変更することができ、上記記載した条件に限らない。また、本発明のプレートは、pADPR 及び／又はヒストン H1 が固相化されていれば良く、上記の洗浄及びブロッキング処理の有無によって限定されるものではない。

(d) 生体試料 (検体)

本発明で用いる生体試料は、神経系疾患を検出する被験者から採取されるものである。生体試料としては、体液を用いることができ、具体的には血液、唾液、漿液、リンパ液等を用いることができ、血清であってもよい。

10 (e) ELISA

本発明において、抗体量の測定には例えば ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) 法を用いることができる。

本発明において、ELISA 法はまず、上記 (c) で得られた本発明のプレートに上記 (d) で得られた生体試料を添加する。添加する生体試料は、TBS や PBS  
15 や生理食塩水等で希釈して添加することもできる。本発明のプレートに添加する生体試料の量は、96 well プレートの場合、50~100 $\mu$ l であることが好ましい。添加後、プレートを室温で1時間静置する。次にプレートを TBS や PBS 等のバッファーで1~5回洗浄する。

続いて二次抗体を加え、室温で1時間反応させた後、前述のようにプレートを  
20 洗浄する。本発明において、抗体希釈は200倍で、希釈反応液は1% BSA、0.4% スキムミルク及び0.02%  $\text{NaN}_3$  を含有する TBS にて行うことができるが、これに限定されない。二次抗体としては、抗 pADPR IgG 又は抗ヒストン H1 IgG を検出するためには抗ヒト IgG 抗体を、抗 pADPR IgA 又は抗ヒストン H1 IgA を検出するためには抗ヒト IgA 抗体を用いることができる。特に、抗ヒト IgG 抗体と  
25 しては、ヒト IgG サブクラス G1、G2、G3、G4 に特異的な抗体を用いることもできる。二次抗体はピオチン、アビジン又は HRP (horse radish peroxidase) など  
で標識化されたものであってもよい。

次に、二次抗体を三次抗体又は三次試薬を用いて発色等により検出する。二次抗体に、前記のビオチン又はアビジン標識抗ヒト抗体を用いる場合、三次試薬としてアルカリフォスファターゼ標識アビジン又はビオチンを用い、発色基質にはパラニトロフェニールホスフェイトを用いて発色させることができる。前記の

5 HRP 標識二次抗体を用いる場合、三次試薬として TMB (tetramethyl benzidine) を用いて発光させることができる。あるいは三次抗体として HRP などで標識した抗体、例えば二次抗体がマウス由来 IgG のときは HRP 標識抗マウス IgG 抗体を、二次抗体がラット由来 IgG のときは HRP 抗ラット IgG 抗体を用いて発光させることができる。検出は当業者であれば適宜方法を選択して実行することができる。

10

シグナルの検出は、プレートリーダーを用いて、発色、発光系に即した波長で吸光度を測定することで行うことができる。例えば、アルカリフォスファターゼ標識系の場合は 405 nm における吸光度を、又は HRP 標識系であって停止液に硫酸を用いる場合は 450 nm における吸光度を測定して、抗体価とすることができる。

15

#### (6) 神経系疾患の検出

神経系疾患の検出には、二次抗体に抗ヒト IgG 抗体又は抗ヒト IgA 抗体を用いたときには、抗 pADPR 抗体（抗 pADPR IgG、抗 pADPR IgA を含む）及び／又は抗ヒストン H1 抗体（抗ヒストン H1 IgG、抗ヒストン H1 IgA を含む）の抗体価を指標とすることができる。この場合、抗 pADPR 抗体及び／又は抗ヒストン H1 抗体の抗体価が平均値よりも高いときには、神経系疾患である可能性が高い。

20

神経系疾患、例えば AD 及び SDAT の患者では、自己抗体（ここでは抗 pADPR 抗体及び／又は抗ヒストン H1 抗体）のサブクラスが主に IgG1 及び IgG2 である。これに対し、代表的な自己免疫疾患である全身性エリテマトーデス患者の自己抗体のサブクラスは IgG2 が主である。したがって、IgG1 と IgG2 との比（G1/G2）を測定することにより、その値を指標として自己免疫疾患と区別して神経系疾患の検出を行うことができる。例えば、G1/G2 値が高いときは、神経系疾患である

25

可能性が高いと判断でき、G1/G2 値が小さいときは、神経系疾患である可能性が小さいと判断することができる。

### (7) キット

本発明のキットは、神経系疾患の検出方法の実施に用いる本発明のプレートを  
5 含むものである。本発明のキットは、本発明の方法の実施に必要な要素をさらに  
含んでいても良い。そのような要素としては、例えば、生体試料を遠心処理する  
ためのチューブ、プレート洗浄用のバッファ（例えば TBS、PBS、溶液 A）、  
ブロッキング用の溶液、二次抗体、二次抗体希釈用溶液、標準用抗 pADPR 抗体  
及び／又は抗ヒストン H1 抗体、発色又は発光反応液、発色停止液、チップ、チ  
10 ューブなどが挙げられる。

## 3. 神経系疾患の診断方法

本発明は、ポリ ADP-リボース及び／又はヒストン H1 と生体試料とを反応さ  
せて、ポリ ADP-リボースに対する抗体及び／又はヒストン H1 に対する抗体を  
15 検出することを特徴とする神経系疾患の診断方法を提供する。本発明の診断方法  
は、上記 2. の神経系疾患の検出結果を利用して診断することができる。

神経系疾患の診断は、二次抗体に抗ヒト IgG 抗体又は抗ヒト IgA 抗体を用いた  
ときには、抗 pADPR 抗体（抗 pADPR IgG、抗 pADPR IgA を含む）及び／又は  
抗ヒストン H1 抗体（抗ヒストン H1 IgG、抗ヒストン H1 IgA を含む）の抗体価  
20 を指標とすることができる。この場合、抗 pADPR 抗体及び／又は抗ヒストン H1  
抗体の抗体価が健常人の値よりも高いときには、生体試料を提供した患者は神経  
系疾患を罹患している可能性が高いと判断することができる。

あるいは、神経系疾患の診断は、二次抗体に抗ヒト IgG サブクラス特異的な抗  
体を用いて G1/G2 を測定したときに、その値を指標とすることができる。例えば  
25 G1/G2 値が SLE 患者よりも大きいときには、当該試料の由来の患者は、SLE で  
はなく神経系疾患を罹患している可能性が高いと判断することができる。

また、神経系疾患の患者では、抗 H1 抗体の産生量と抗 pADPR 抗体の産生量

とが相関関係を示す。この関係は、抗 H1 抗体陽性の患者では、抗 pADPR 抗体産生が認められ、逆もまた成り立つことを意味する。このことを利用して、抗 pADPR 抗体価が高いことで知られる SLE 患者との差別化を図ることができる。例えば、抗 pADPR 抗体が陽性であって、抗 H1 抗体も陽性の場合、神経系疾患を SLE から区別することができる。したがって、抗 pADPR 抗体だけでなく抗 H1 抗体を検出することで、あるいは抗 H1 抗体のみを検出することで、SLE と区別して神経系疾患を検出し診断することができる。

### 実施例

- 10 以下、実施例により本発明を具体的に説明する。但し、本発明はこれら実施例に限定されるものではない。

#### 実施例 1

抗 pADPR 抗体及び抗 H1 抗体を用いた AD 又は SDAT の診断方法

##### 1-1. 方法

- 15 (1) pADPR の合成と精製

本発明者が開発した方法[Kanai Y, Kawamitsu H, Tanaka M et al. A novel method for purification of poly(ADP-ribose). J. Biochem 1980; 88: 917-920]により、仔牛胸腺核を酵素源とし、nicotinamide adenine dinucleotide(NAD)を基質として pADPR を合成、精製した。pADPR の平均鎖長は 30 とした。この手法で精製されたポリマーに含まれる DNA やヒストンの割合は 1 % 以下である。

##### (2) ヒストン H1 の精製

全ヒストンの精製は本発明者が開発した方法[Kanai Y, Sugimura T. Comparative studies on antibodies to poly(ADP-ribose) in rabbits and patients with systemic lupus erythematosus. Immunology 1981; 43: 101-110.]を用いた。

すなわち、ヒト前骨髄性白血病細胞株 HL60 細胞核より全ヒストンを単離し、さらに陽イオンカラム HiTrap SP (Amersham Biosciences)を用い、酸性(pH3.5)

条件下で NaCl の濃度勾配によって全ヒストンから H1 のみを分離した。

全ヒストンは、0.25M NaCl + 25mM トリス緩衝液(pH7.4) (溶液 A) に対して透析し、可溶化に成功した。なお、得られた H1 標品に含まれる DNA の含有量は 1% 以下であった。

### 5 (3) 抗 pADPR 抗体測定法

抗 pADPR 抗体は、固相酵素抗体法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)にて測定した。

10 Immulon 2HB マイクロタイタープレートを固相とし、pADPR は溶液 A で 1  $\mu\text{g/ml}$  に希釈し、各ウェルに 50  $\mu\text{l}$  加え 4℃で一昼夜静置した。その後、TBS (25mM トリス, 140mM NaCl, 0.04%窒化ソーダ ( $\text{NaN}_3$ ), pH7.4)で洗浄し、次いで 2%スキムミルク含有 TBS にて室温で 1 時間反応させ、抗原未吸着部位を遮蔽した。最後に TBS で 3 回洗浄し、ELISA 用抗原プレートを作製した。

血清希釈は 200 倍とし、希釈反応液は、1%牛血清アルブミン (BSA)、0.4%スキムミルク、及び 0.02%  $\text{NaN}_3$  を含有する TBS にて行った。

15 二次抗体には、ビオチン標識抗ヒトサブクラス (G1,G2,G3,G4) 特異的抗体 (Zymed 社) を使用した。また、第三次試薬としてアルカリフォスファターゼ標識アビジン(Zymed 社) を用い、発色用基質にはパラニトロフェニールホスフェイトを用いた。抗体価は A405 で表した。

### (4) 抗 H1 抗体測定法

20 抗 H1 抗体の測定は、使用する抗原を H1 としたこと以外は、抗 pADPR 抗体測定法に準じて行った。

### (5) 検体

25 6 例の AD 及び 20 例の SDAT を試験群とした。対照群として、AD 及び SDAT のいずれでもない高齢者 59 例 (平均年齢  $77 \pm 7$  歳)、40 例の全身性エリテマトーデス(SLE)患者、及び 60 歳以下の健常人 27 例を使用した。試験群及び対照群の血清を検体として ELISA に使用した。AD 及び SDAT の診断は、DMS-IV (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 4th ed., American

Psychiatric Association, Washington, D.C., 1994)に従い、また SLE の診断はアメリカリウマチ学会診断基準(Updating the American College of Rheumatology Revised Criteria for the Classification of SLE (1997))に従って行った。

## 1 - 2. 結果

### 5 AD と抗 pADPR 抗体及び抗 H1 抗体との関係：

AD 患者及び SDAT 患者をあわせた 26 例の結果を図 2 に示す。SLE 患者 40 例の結果を図 3 に示す。

抗 pADPR 抗体については、6 例の AD 中 6 例(100%)が陽性を示し、また SDAT では 20 例中 15 例(75%)が陽性を示した（図 2 「Anti-pADPR」）。また抗 H1 抗体については、AD で 50%(3/6)、SDAT で 65%(13/20)が陽性であった（図 2 「Anti-H1」）。図 2 及び図 3 中のカラムは健常人の平均値（縦軸）及び 2 S D（横軸）を示す。

なお、AD 患者及び SDAT 患者において抗 H1 陽性者は抗 pADPR 抗体も全て陽性であり、相関係数(r)は 0.768 となった（図 4）。一方、抗 pADPR 抗体価が高いことで知られる SLE 患者[Kanai Y, Kawamitsu Y, Miwa M, Matsushima T, Sugimura T. Naturally-occurring antibodies to poly(ADP-ribose) in patients with systemic lupus erythematosus. Nature 1977; 265: 175-177] 40 症例で同様の検査を行ったところ、その相関係数は 0.184 となり、有意の差( $p < 0.01$ )をもって低値を示した（図 3 及び図 5）。

20 以上の結果は、AD あるいは SDAT 患者の生体内、特に脳でヒストン H1 が pADPR で修飾されていることを示唆するとともに、抗 H1 及び抗 pADPR 抗体の産生機構が膠原病 SLE 患者と異なることを示している。さらに特記すべきことは、2~3 の症例で調べた結果、自己抗体のサブクラスが SLE では IgG2、一方 AD/SDAT では IgG1 と IgG2 の両者であった。このことは、AD/SDAT 患者と SLE 患者との間で自己抗体産生機構に差があることをさらに支持するものである。従って、G1/G2 比は AD や SDAT といった神経系疾患の診断上、有力な指標になると言える。

## 実施例 2

### 抗 pADPR IgA の測定による AD 診断方法

#### 2-1. 方法

##### 5 (1) 抗 pADPR 抗体測定法

抗 pADPR 抗体は、固相酵素抗体法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)にて測定した。

ELISA 用抗原プレートは実施例 1 (3) で作製したものを使用した。

ELISA 用抗原プレートを洗浄液 (0.025M Tris、0.25M NaCl、0.1% Tween-20 ;  
10 pH7.4) で 3 回洗浄した。プレートに反応用溶液 (0.025M Tris、0.14M NaCl、  
10% NCS ; pH7.4) を 50  $\mu$ l/well、検体を 5  $\mu$ l/well 分注した。検体は、検体 10  
 $\mu$ l を反応用溶液 200  $\mu$ l で 21 倍に希釈したものを使用した。プレートを振とう  
後、プレート表面をシールし、4℃で一晩湿潤環境下にて反応させた。反応後プ  
レートで 3 回洗浄し、二次抗体を 50  $\mu$ l/well 分注し、プレート表面をシ  
15 ールして室温で、60 分湿潤環境で反応させた。反応後、プレートを洗浄液で 3  
回洗浄した後、基質の TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine) (Sigma T0440)  
を 50  $\mu$ l/well 分注し、プレート表面をシールし、室温で 10~15 分暗所にて反応  
させた。続いて、反応停止液 [1 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Abbott 7212) ] を 50  $\mu$ l/well 分注  
し、反応を止め、450nm の吸光度を測定した。

##### 20 (2) 二次抗体

二次抗体には、HRP 標識した抗ヒト IgG 抗体 (Monosan #PS104P) 、HRP  
標識した抗ヒト IgA 抗体 (Monosan #PS106P) を反応用溶液で各々 1000 倍希釈  
したものを使用した。

##### (3) 検体

25 健常人 (Healthy individuals) 血清 (10 検体) として、市販血清から 50 歳以  
上を選択して使用した。AD 患者血清 (47 検体) として、市販血清を使用した。

#### 2-2. 結果

結果を表 1 及び図 6 に示す。

表 1

AD 患者における抗 pADPR IgG、抗 pADPR IgA を用いた診断における正診率

	cut-off	AD patients		Healthy individuals		accuracy
		positive	negative	positive	negative	
IgG測定系	0.7	34/46 (74%)	12/46 (26%)	4/10 (40%)	6/10 (60%)	40/56 (71%)
IgA測定系	0.1	25/47 (53%)	22/47 (47%)	4/10 (40%)	6/10 (60%)	31/57 (54.5%)

5

### (1) IgG 測定系

ROC 曲線 (receive operating characteristic curve ; 受診者動作特性曲線) から cut-off 値を 0.7 に設定すると、AD 患者血清で 34/46 (74%) の検出率となったが、12/46 (26%) が偽陰性 (false negative) (表 1 及び図 6 「AD patients (IgG)」)、また、健常人血清の内、4/10 (40%) が偽陽性 (false positive) となった (表 1 及び図 6 「Healthy individuals (IgG)」)。正診率 (accuracy) は、71%であった (表 1、図 6)。

10

### (2) IgA 測定系

IgA 測定系は、ROC 曲線から cut-off 値を 0.1 に設定すると、AD 患者血清の内、22/47 (46.8%) が偽陰性となり (表 1 及び図 6 「AD patients (IgA)」)、健常人血清の内、4/10 (40%) が偽陽性となった (表 1 及び図 6 「Healthy individuals (IgA)」)。正診率は、54.5%となる (表 1、図 6)。

15

一般的に、IgA は血清中で IgG に次いで多量に存在し、血中以外に唾液、漿液中に存在することが知られている。血清中の抗 pADPR IgA 抗体が測定できたことで、この測定系が唾液にも応用できる可能性が示唆された。また、抗 pADPR IgA、抗 H1 IgA を測定することにより、その値を指標として被験患者が AD 又は SDAT であるのかを判断することができる。

20

産業上の利用の可能性



本発明の方法は、抗ポリ ADP-リボース抗体及び／又は抗ヒストン H1 抗体の産生を指標に用いており、ポリ ADP-リボース及び／又はヒストン H1 を固相化した ELISA 系によって、簡便に当該抗体の産生を検出できる。このため、神経系疾患を検出し、診断することが容易になった。

- 5      また、IgG サブクラスである G1/G2 比を算出することで、又は抗ポリ ADP-リボース抗体及び抗ヒストン H1 抗体若しくは抗ヒストン H1 抗体を検出することで、自己免疫疾患である SLE と区別して神経系疾患を検出し診断することが可能となった。

- 10      また、抗 pADPR IgA、抗 H1 IgA を用いて神経系疾患を検出し診断することが可能となった。

明細書中の参考文献は、全体を通して本明細書に組み込まれるものとする。

## 請求の範囲

1. ポリ ADP-リボース及び/又はヒストン H1 と生体試料とを反応させて、ポリ ADP-リボースに対する抗体及び/又はヒストン H1 に対する抗体を検出することを特徴とする、神経系疾患の検出方法。  
5
2. 生体試料が体液である請求項 1 記載の方法。
3. 生体試料が血液、唾液、漿液及びリンパ液からなる群から選択される少なくとも一つである請求項 1 記載の方法。
4. 生体試料が血清である請求項 1 記載の方法。
- 10 5. 神経系疾患がアルツハイマー病又はアルツハイマー型老年痴呆症である請求項 1 記載の方法。
6. 抗体の検出が、IgG1 と IgG2 との比を指標とするものである請求項 1 記載の方法。
7. 抗体の検出が、IgG 又は IgA の値を指標とするものである請求項 1 記載の方法。  
15
8. ポリ ADP-リボース及び/又はヒストン H1 と生体試料とを反応させて、ポリ ADP-リボースに対する抗体及び/又はヒストン H1 に対する抗体を検出することを特徴とする、神経系疾患の診断方法。
9. 生体試料が体液である請求項 8 記載の方法。
- 20 10. 生体試料が血液、唾液、漿液及びリンパ液からなる群から選択される少なくとも一つである請求項 8 記載の方法。
11. 生体試料が血清である請求項 8 記載の方法。
12. 神経系疾患がアルツハイマー病又はアルツハイマー型老年痴呆症である請求項 8 記載の方法。
- 25 13. 抗体の検出が、IgG1 と IgG2 との比を指標とするものである請求項 8 記載の方法。
14. 抗体の検出が、IgG 又は IgA の値を指標とするものである請求項 8 記載の方法。

方法。

- 1 5. ポリ ADP-リボース及び/又はヒストン H1 を含む、神経系疾患の診断又は検出用キット。
- 1 6. 神経系疾患がアルツハイマー病又はアルツハイマー型老年痴呆症である請求項 1 5 記載のキット。
- 1 7. ポリ ADP-リボース及び/又はヒストン H1 が固相に固定された、神経系疾患の診断又は検出用プレート。
- 1 8. 神経系疾患がアルツハイマー病又はアルツハイマー型老年痴呆症である請求項 1 7 記載のプレート。
- 10 1 9. ヒストン H1 を、0.25 M NaCl 及び 25 mM トリス緩衝液(pH7.4)からなる溶液で希釈した後、固相に固定することを特徴とする、ヒストン H1 の固相への固相化方法。

図 1

ADPR の構造式

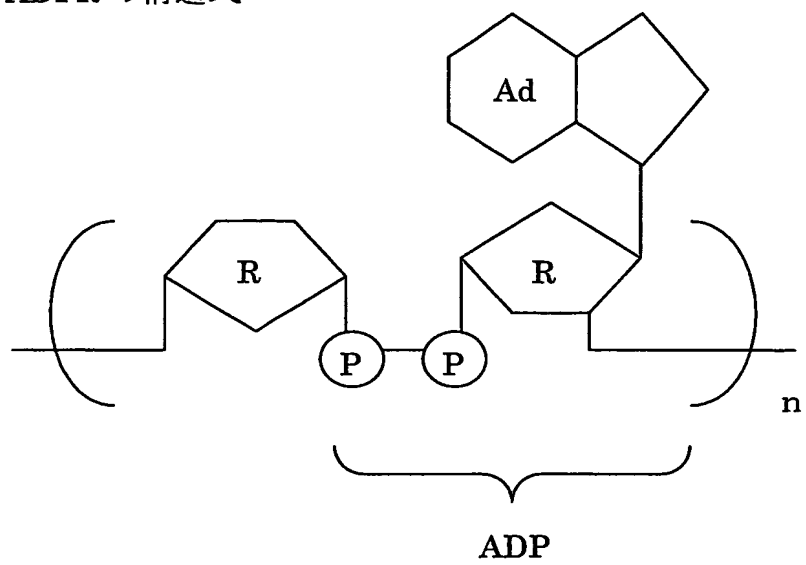


図 2

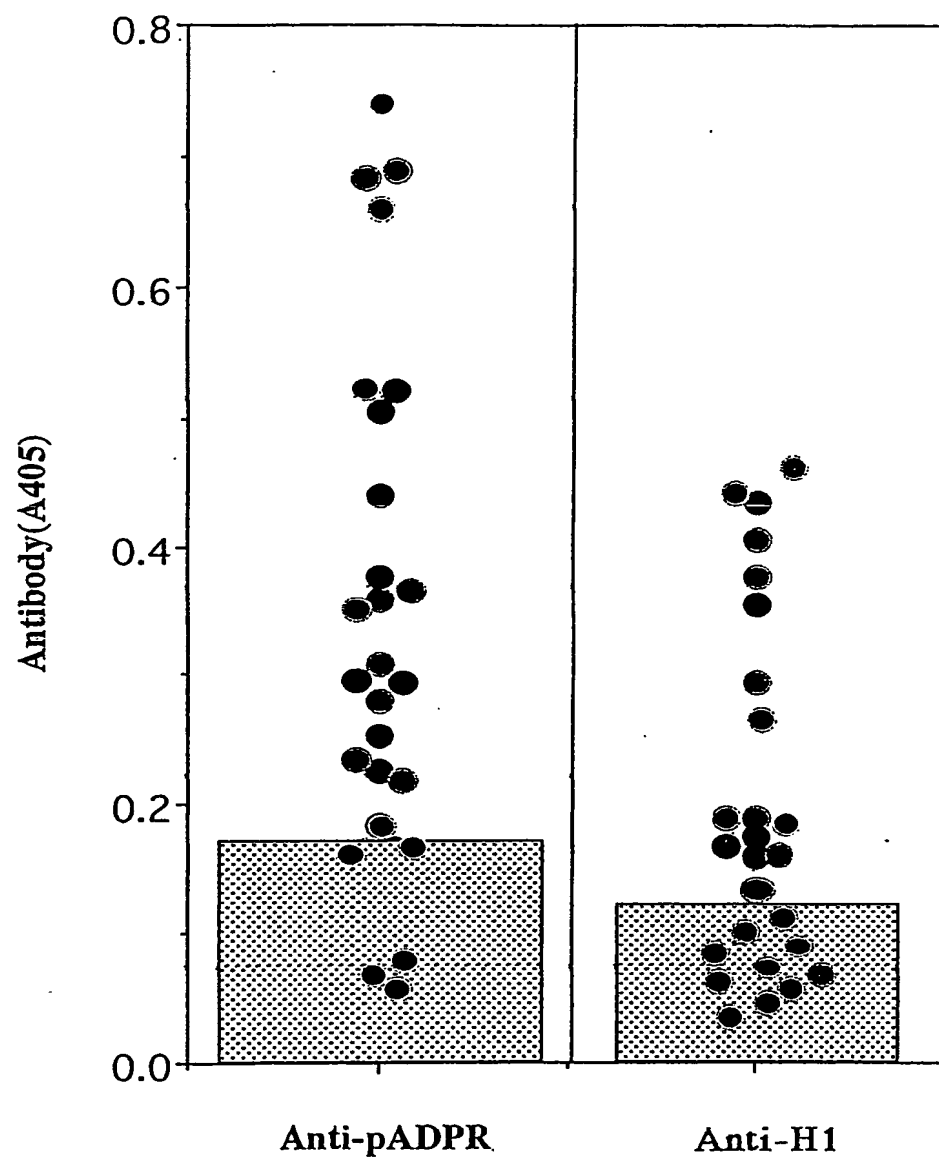


図 3

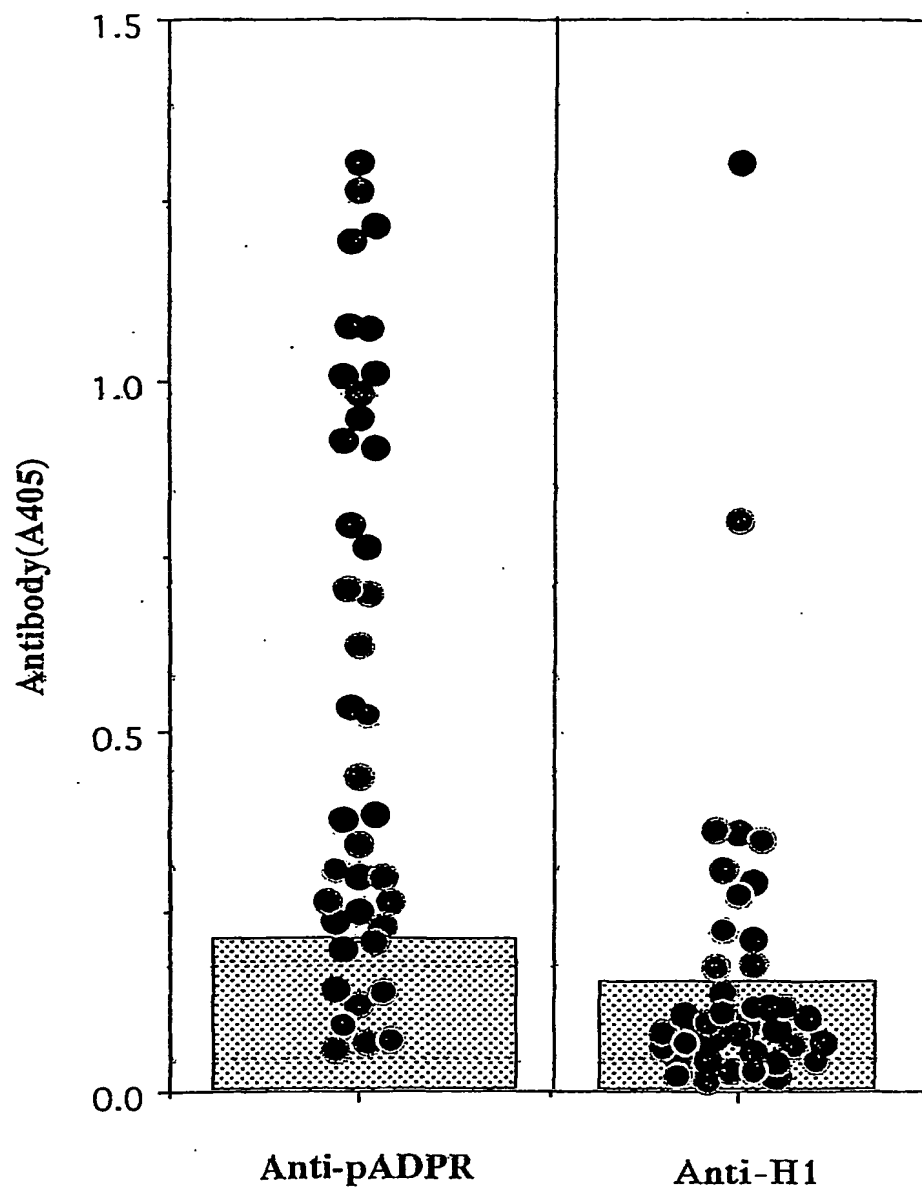


図 4

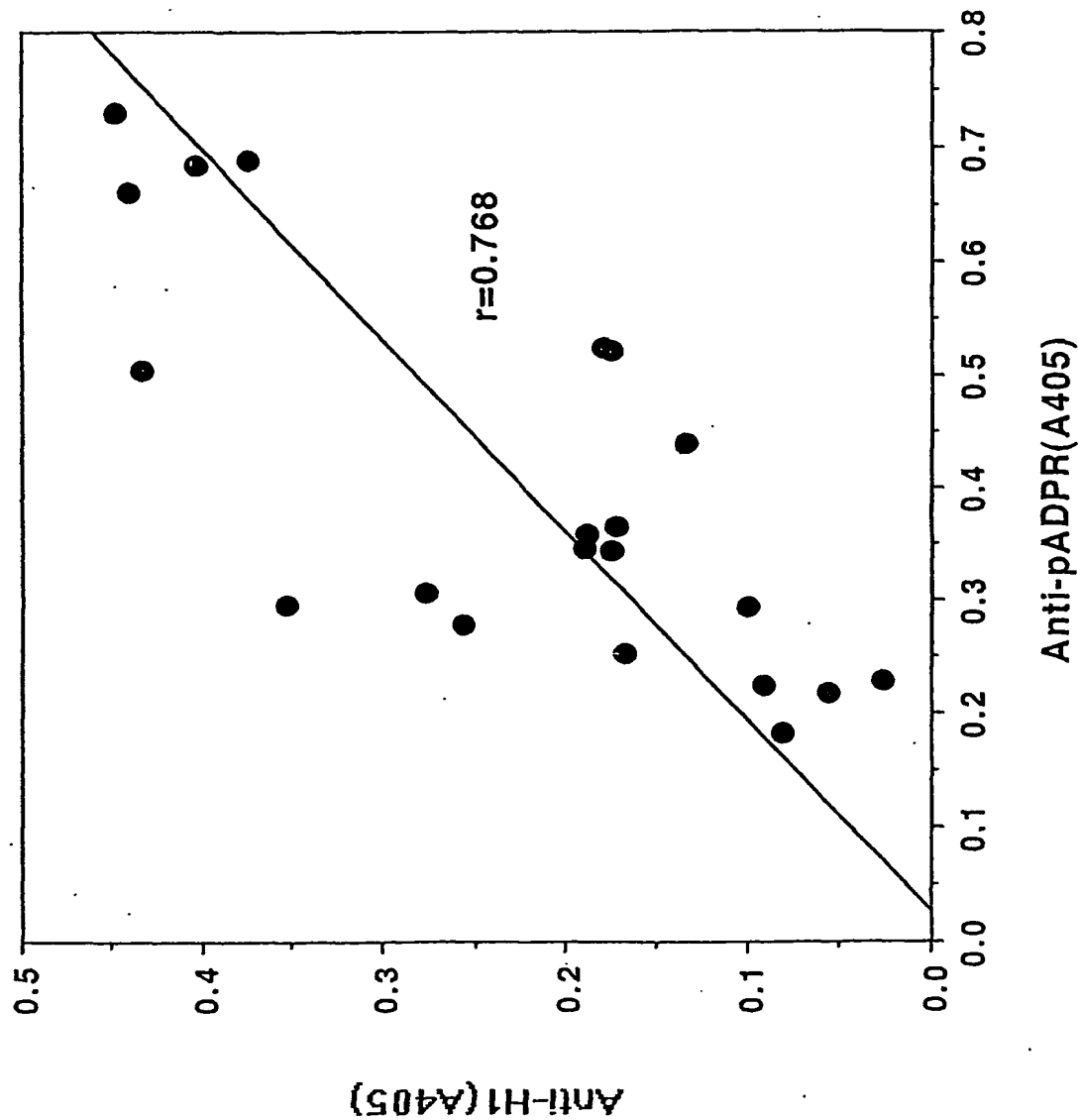


図 5

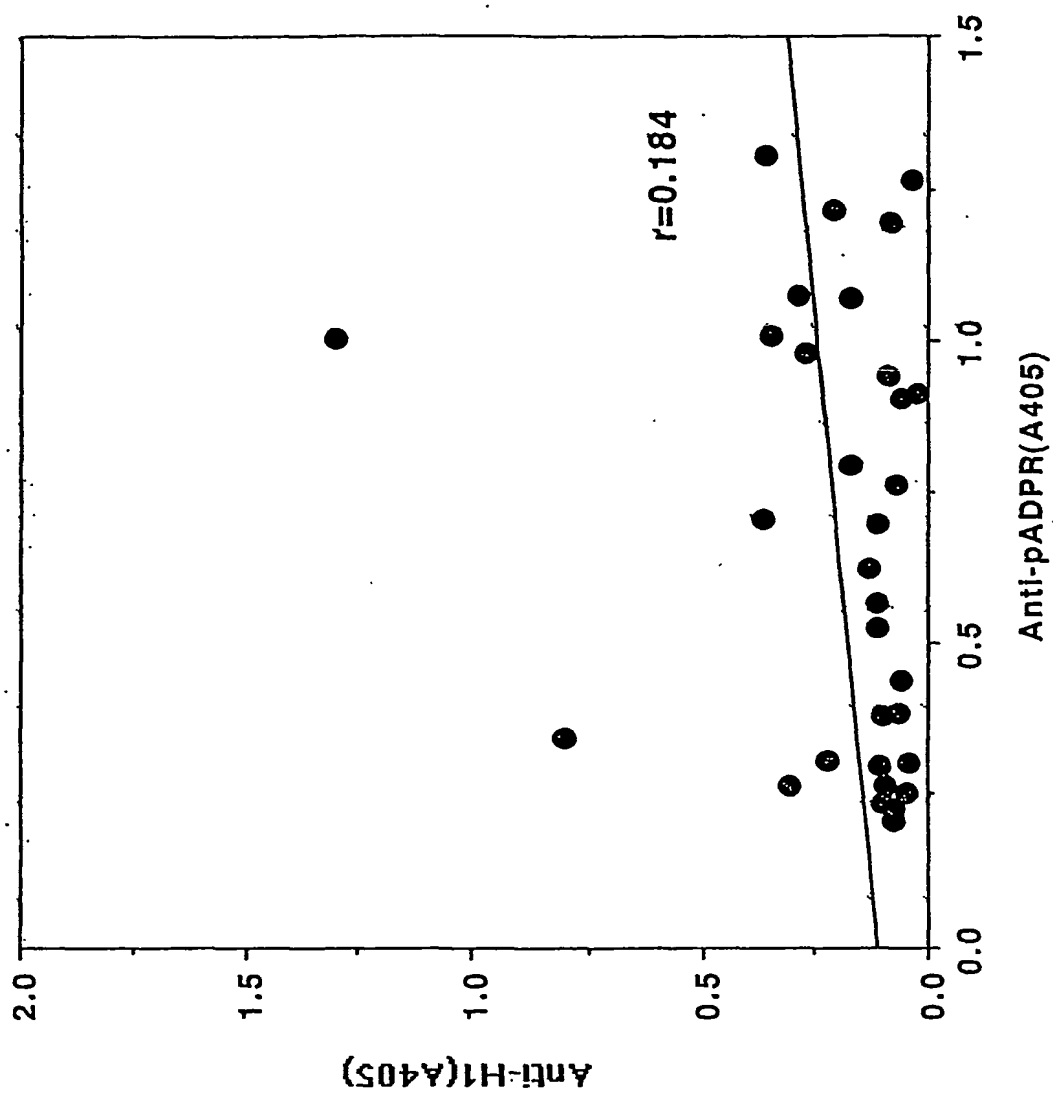
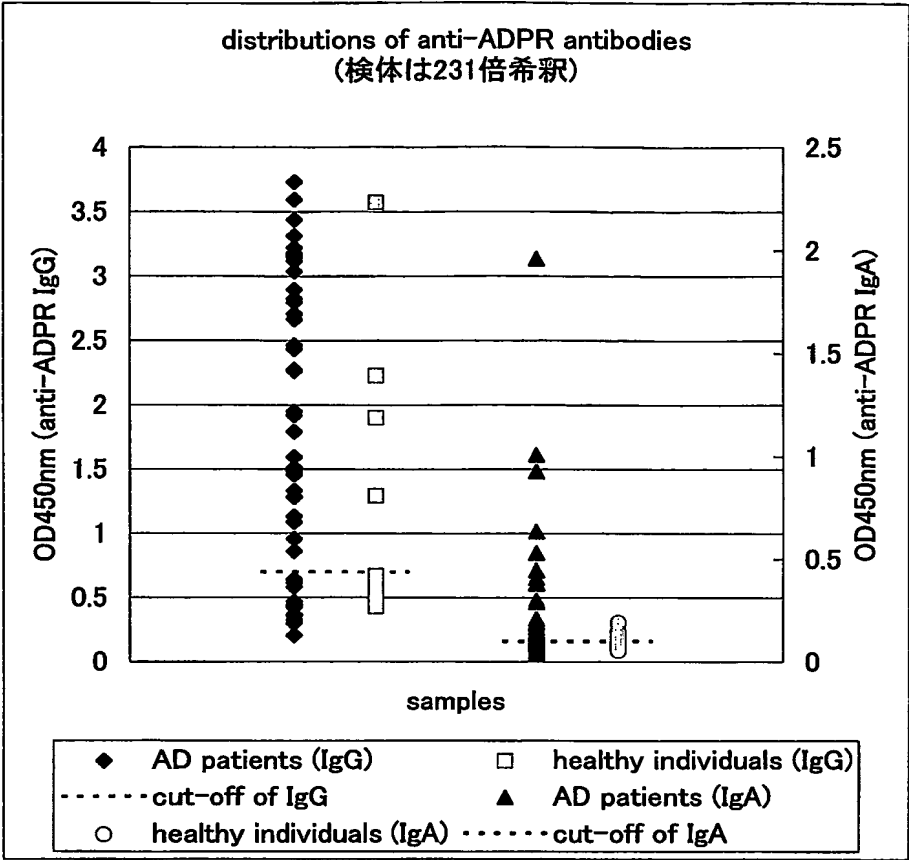




図 6



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/016483

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
Int.Cl<sup>7</sup> G01N33/53, G01N33/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
Int.Cl<sup>7</sup> G01N33/53-579, G01N33/68

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched  
Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2005  
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2005 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2005

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
JICST(JOIS), CA(STN)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y/A	JP 4-32766 A (Morinaga & Co., Ltd.), 04 February, 1992 (04.02.92), Page 2, lower right column, line 13 to page 3, upper left column, line 5 (Family: none)	19/1-7, 15-18
Y/A	WO 2002/076377 A (Center for Advanced Science and Technology Incubation, Ltd. (CASTI)), 03 October, 2002 (03.10.02), Pages 30 to 31 & JP 2002-574893 A & AU 202238994 A1	19/1-7, 15-18
A	JP 2003-531376 A (NIADYNE CORP.), 21 October, 2003 (21.10.03), & WO 2001/079842 A & US 6716635 A & EP 1272843 A	1-7, 15-19

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance  
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date  
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)  
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means  
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention  
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone  
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art  
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
20 January, 2005 (20.01.05)

Date of mailing of the international search report  
08 February, 2005 (08.02.05)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/016483

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 63-121752 A (Mitsui Toatsu Chemicals, Inc.), 25 May, 1988 (25.05.88), (Family: none)	1-7, 15-19
A	JP 58-56694 A (Mitsui Seika Kogyo Kabushiki Kaisha), 04 April, 1983 (04.04.83), (Family: none)	1-7, 15-19

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2004/016483

**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 8-14  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
Claims 8 to 14 pertain to diagnostic methods and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required to search.
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

The special technical feature of the inventions according to claims 1 to 7 and 15 to 18 resides in using poly ADP-ribose and/or histone H1 as reagent(s) in detecting a nervous system disease and detecting an antibody against poly ADP-ribose and/or an antibody against histone H1 in a biological sample.

On the other hand, the special technical feature of the invention according to claim 19 resides in dilution of histone H1 in immobilizing histone H1 on a solid phase.

Since it does not appear that there is a technical relationship between these groups of inventions involving one or more of the same or corresponding special technical features, they are not (continued to extra sheet)

1. ☒ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
☒ No protest accompanied the payment of additional search fees.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2004/016483

Continuation of Box No.III of continuation of first sheet (2)

considered as being so linked as to form a single general inventive concept.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl <sup>7</sup> G01N33/53, G01N33/68		
B. 調査を行った分野		
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl <sup>7</sup> G01N33/53-579, G01N33/68		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
日本国実用新案公報 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2005年 日本国登録実用新案公報 1994-2005年 日本国実用新案登録公報 1996-2005年		
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)		
JICST (JOIS), CA (STN)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y/A	JP 4-32766 A (森永製菓株式会社) 1992. 02. 04 第2ページ右下欄第13行-第3頁左上欄第5行 (ファミリーなし)	19/1-7, 15-18
Y/A	WO 2002/076377 A (株式会社先端科学技術インキュベーションセン ター) 2002. 10. 03 第30-31頁 & JP 2002-574893 A & AU 2002238994 A1	19/1-7, 15-18
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日	
20. 01. 2005	08. 2. 2005	
国際調査機関の名称及びあて先	特許庁審査官 (権限のある職員)	2 J 9 2 1 7
日本国特許庁 (ISA/J P)	山村 祥子	
郵便番号 100-8915	電話番号 03-3581-1101	内線 3251
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	JP 2003-531376 A (ナイアダイン コーポレーション) 2003.10.21 & WO 2001/079842 A & US 6716635 A & EP 1272843 A	1-7, 15-19
A	JP 63-121752 A (三井東圧化学株式会社) 1988.05.25 (ファミリーなし)	1-7, 15-19
A	JP 58-56694 A (三井製菓工業株式会社) 1983.04.04 (ファミリーなし)	1-7, 15-19

## 第Ⅱ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 8-14 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、  
請求の範囲 8-14 は診断方法であり、国際調査をすることを要しない対象に係るものである。
2. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

## 第Ⅲ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

請求の範囲1-7, 15-18に係る発明の特別な技術的特徴は、神経系疾患の検出に際してポリADP-リボース及び/又はヒストンH1を試薬として使用し、生体試料中のポリADP-リボースに対する抗体及び/又はヒストンH1に対する抗体を検出することに関するものである。

一方、請求の範囲19に係る発明の特別な技術的特徴は、ヒストンH1を固相に固定化する際のヒストンH1の希釈に関するものである。

これらの発明は、一又は二以上の同一又は対応する特別な技術的特徴を含む技術的な関係にないから、単一の一般的発明概念を形成するように連関しているものとは認められない。

1. ☒ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

## 追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- ☒ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**